

重组腺病毒载体 Ad-LMP-1 的构建及其转染 MSC 后成骨活性

程志安¹, 刘冬斌³, 吴燕峰², 黄霖², 沈慧勇², 刘尚礼²

(1. 广州中医药大学第二附属医院//广东省中医院骨科, 广东 广州 510120;

2. 中山大学附属第二医院骨科, 广东 广州 510120; 3. 佛山市南海区人民医院骨科, 广东 佛山 528200)

摘要:【目的】快速构建大鼠 LIM 矿化蛋白-1 基因重组腺病毒载体, 转染 MSC, 探讨 LMP-1 基因对 MSC 成骨分化和成骨活性的影响。【方法】从大鼠成骨细胞内提取总 RNA, 并设计 LMP-1 特异性引物进行 RT-PCR, 获取 LMP-1 基因后利用 Invitrogen 公司的 TOPO 定向克隆技术创建入门克隆 pENTR/D-LMP-1。转化 TOP10 细菌后, 挑取阳性克隆摇菌提取质粒, 入门克隆再与表达载体 pAD/CMV/V5-DEST 进行同源重组反应得到病毒载体 pAD/CMV/V5-LMP-1, 转化细菌后挑取阳性克隆摇菌提取重组病毒质粒, 用 PacI 内切酶线性化后用转染 293A 细胞后得到重组腺病毒载体。以腺病毒为载体, 将大鼠 LMP-1 基因体外转染于 3 代大鼠 MSC 细胞内, 检测 LMP-1 基因在 MSC 细胞的表达, 分别观察转染后实验组与对照组 I 型胶原、碱性磷酸酶、骨钙素表达变化以及骨钙结节的形成情况, 评价 LMP-1 基因的成骨能力。【结果】成功获取大鼠 LMP-1 基因, 入门质粒与病毒表达质粒经过酶切鉴定以及测序验证。LMP-1 基因能在 MSC 中高效表达, 转染后 MSC 的 I 型胶原、碱性磷酸酶、骨钙素的表达明显增强, 骨钙结节形成增多。【结论】利用 Gateway 技术构建 LMP-1 重组腺病毒载体相对简单, 可快速获得的 pAd-LMP-1。pAd-LMP-1 转染 MSC 后, LMP-1 基因能促进 MSC 向成骨细胞分化, 增强其成骨作用。

关键词: LIM-1 矿化蛋白; 间充质干细胞; 成骨活性; 基因转染

中图分类号: R329.2+8

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)02-0199-07

Osteogenic Activity of MSC Infected by Recombinant Adenovirus Vector Ad-LMP-1

CHENG Zhi-an¹, LIU Dong-bin³, WU Yan-feng², HUANG Lin², SHEN Hui-yong², LIU Shang-li²

(1. Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Chinese Medicine University (Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine), Guangzhou 510120, China;

2. Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

3. Department of Orthopaedics, The People's Hospital of Nanhai District, Foshan 528200, China)

Abstract: 【Objective】 This study was designed to construct a recombinant adenovirus vector contains LMP-1 gene, and investigate the osteoinductive activity of MSC which were transfected recombinated adenoviral vector carrying LMP-1 gene. 【Methods】 Total RNA was extracted from rat osteoblast and the LMP-1 gene was acquired by RT-PCR, the LMP-1 gene and entry vector pENTR/D-TOPO were used to create the entry clone with the directional TOPO clone technology, then the entry clone and the expression vector were used to create the expression clone through the LR recombination reaction. The adenovirus expression clone was linearized by PacI and transfected to the 293A cell line to harvest a high titer. Ad-LMP-1 was infected into the 3rd passage MSC, the expression of LMP-1 was detected by Western blot. The osteogenic activity of MSC was evaluated by the expression of collagen I, ALP, osteocalcin and the formation of bone nodule. 【Result】 The LMP-1 gene was successfully acquired and confirmed, the entry clone and the expression clone were both verified by enzymes digestion, and the expression clone was further confirmed by sequenced. The expression of LMP-1 was detected successfully in MSC. The increasing expression of collagen I, osteocalcin, ALP and bone nodule were observed by comparing to the control group. 【Conclusion】 Gateway technology not only

收稿日期: 2009-07-21

基金项目: 广东省自然科学基金(5001761); 2005 年国家教育部留学回国人员科研启动基金。

作者简介: 程志安, 医学博士, 副教授、副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 骨质疏松症的基因治疗, E-mail: zhiancheng@gmail.com

make construction of the pAd-LMP-1 recombination adenovirus vector simple and fast, but also get a high transfection efficacy in MSC. LMP-1 gene can induce the osteoblast differentiation of MSCs, and improve its osteogenic activity. The adenovirus vector is reliable to be used in further gene therapy research.

Key words: LIM mineralization protein-1; mesenchymal stem cells; osteogenic activity; gene transfect

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(2): 199-206]

LIM矿化蛋白-1(LIM mineralization protein-1, LMP-1)是直接参与成骨分化的细胞内因子,它的成骨作用可能表现在参与合成和分泌其他的成骨诱导蛋白如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMP)以及转化生长因子 β 1(transforming growth factor β ₁, TGF- β ₁),同时招募附近的细胞分化直接参与骨膜或软骨内成骨。在动物或体外实验中,小剂量的含 LMP-1 基因的腺病毒或质粒载体转染骨髓基质细胞,可持续稳定地诱导骨形成^[1]。LMP-1 的高效骨诱导特性为治疗骨质疏松性骨折提供了新的选择。本研究用 Gateway 技术构建 LMP-1 重组腺病毒载体,以腺病毒为载体,将 LMP-1 基因导入间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC),通过比较实验组与对照组中 MSC 成骨活性的差异,来进一步验证 LMP-1 的骨诱导作用,为后续的 LMP-1 基因治疗骨质疏松及其骨折研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

新生牛血清购于杭州四季青生物;低糖 DMEM 培养基购于 Gibco 公司;I 型胶原酶、II 型胶原酶购于 Sigma 公司;Trizol、DEPC、RT-PCR 试剂盒、Pfu 高保真聚合酶、琼脂糖、DNA 回收试剂盒、DNA 标准 Marker、质粒小提试剂盒、病毒 DNA 提取试剂盒均购于 Takara(大连)公司;入门载体试剂盒(含 TOP10 感受态菌)、表达载体 pAD/CMV/V5-DEST(含 293A 细胞)、LR Clonase™ 酶购于 Invitrogen 公司;内切酶 *Not* I、*Asc* I、*Pac* I 均购于 NEB 公司。MSC 诱导药物地塞米松、胰岛素、 β 磷酸甘油、IBMX、维生素 C、吡哆美辛购于 Sigma 公司,染色试剂油红 O、茜素红购于 AMRESCO 公司,免疫组化用一抗兔抗大鼠 I 型胶原,兔抗大鼠骨钙素、二抗羊抗兔 IgG 及 SABC 试剂盒均购于武汉博士德公司;兔抗大鼠 LMP-1 抗体购于美国 Santa Cruze 公司;碱性磷酸酶 Elisa 检测试剂盒、骨钙素 Elisa 检测试剂盒均购于武

汉华美生物公司。

1.2 大鼠 LMP-1 基因的获取

1.2.1 大鼠成骨细胞的分离与体外培养以及鉴定 取 SD 乳鼠两只放入 750 mL/L 酒精中浸泡 10 min。无菌取颅盖骨,置于含 PBS 液的培养皿中,尽量剔除附着的血管及结缔组织,PBS 液清洗,再将颅盖骨剪成 1 mm × 1 mm 碎块,转移到 50 mL 离心管中,1 g/L 胶原酶(I 型:II 型 = 1:6)消化液 37 °C 水浴消化 20 min,并每隔 2 min 摇晃震荡一次,共消化 4 次,分别取后两次消化液转移至 15 mL 离心管予以 250 × g 离心 10 min,弃去上清液,沉淀即为成骨细胞,用含 100 mL/L 新生牛血清的 L-DMEM 培养液重悬,吹打均匀至单个悬细胞,按 1 × 10⁵/mL 密度接种到 25 cm² 培养瓶中,37 °C、50 mL/L CO₂、饱和湿度下培养,传代。

1.2.2 大鼠成骨细胞总 RNA 的提取 取 2 代大鼠成骨细胞将培养液换成含 1 nmol/L 地塞米松和 100 mL/L 胎牛血清培养液(L-DMEM)诱导培养一周^[1],当细胞融合近 90%后,吸弃培养液,PBS 冲洗两次,按照 Trizol 说明书进行细胞 RNA 提取,每只 25 cm² 中加入 Trizol 液 1 mL,最终所得的 RNA 利用 30 μ L 的 DEPC 水溶解,并对其进行琼脂糖凝胶电泳和分光光度检测,其余的 RNA 置于 -80 °C 冰箱保存。按 $D(260) = 1$ 的 RNA 溶液每 mL 约含 40 μ g RNA 来估算所得到 RNA 的浓度,根据在 260 nm 以及在 280 nm 的读数间的比值 $D(260)/D(280)$ 估计核酸的纯度。

1.2.3 RT-PCR 获取与扩增 LMP-1 基因 RT-PCR 利用 TAKARA RT-PCR 试剂盒进行两步法反应:第一步反应体系选用 Oligo 引物,按照试剂盒说明书依次加入反应体系于 100 μ L PCR 管中,置于 PCR 仪中 45 °C, 25 min, 然后 95 °C, 10 s 使逆转录酶变性,得到的 cDNA 用于 PCR,剩余可保存于 -20 °C。第二链合成中引物根据 Genebank 中大鼠 LMP-1 基因利用 Primer 5 软件设计而成:正义引物:5'-C[ACC ATGG]ATTCCTTCAAGGTAGTGC-3', 反义引物:5'-GGGCTTGTCTTCTTGGAGTAG-3', 其中 CACC 是目的基因与入门载体之间的接头,

并且框中结构形成 Kozak 序列,有助于增强目的基因的表达^[2],预计合成 1 341 bp 的产物。大鼠 GAPDH 内参引物:正义:5'-CAGTGCCAGCCTCG TCTCAT-3',反义:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3',预计合成 571 bp 的产物。聚合酶采用 TAKARA 高保真酶,采用 50 μ L 反应体系进行 30 个循环反应(98 $^{\circ}$ C, 10 s; 56 $^{\circ}$ C, 10 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min 25 s),最后延伸 7 min 后收集产物进行电泳鉴定,并利用 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化回收,测 *D* 值进行浓度分析。

1.3 LMP-1 重组腺病毒载体的构建

1.3.1 LMP-1 与入门载体 pTREN-TOPO 构建入门克隆 根据纯化目的基因的浓度进行 6 μ L 的 TOPO 反应体系:PCR 纯化产物 0.5 μ L、盐溶液 1 μ L、入门载体 1 μ L、无菌水 3.5 μ L,轻轻混匀,室温(约 25 $^{\circ}$ C)静置 5 min 后冰浴 10 min,取 2 μ L TOPO 反应产物进行转化 TOP10 感受态大肠杆菌,最后涂在含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板进行筛选,平板置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱 16 ~ 24 h 后观察阳性克隆。无菌操作下挑取单个阳性克隆置于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基 4 mL 置于 37 $^{\circ}$ C,水平转速为 250 r/min 的恒温摇床摇菌 8 h,按照质粒提取试剂盒说明操作进行质粒提取,并对提取的质粒分别进行 *Not* I、*Ase* I 单酶切和双酶切鉴定。

1.3.2 入门克隆与表达载体 pAd/CMV/DEST-V5 同源重组创建表达克隆 根据入门克隆的浓度进行 LR 重组反应:入门克隆 3 μ L、表达载体 pAd/CMV/DEST-V5 1 μ L、TE 缓冲液 4 μ L、LR ClonaseTM 酶 2 μ L。以上反应体系轻轻混合后置于 25 $^{\circ}$ C 水浴箱过夜,取 2 μ L 反应产物转化 TOP10 感受态大肠杆菌,最后涂板于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养板,置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 16 ~ 24 h 观察阳性克隆,并挑取单个克隆摇菌,提取质粒,电泳鉴定以及利用目的基因引物进行最后测序。

1.4 重组腺病毒载体在 293A 细胞中的包装与扩增

取重组腺病毒质粒约 5 μ g,用 *Pac* I 内切酶酶切使之线性化,同时切去质粒的 Amp⁺和 Ori 位点,暴露病毒的 ITRs 位点,用 7 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切产物。用乙醇沉淀法纯化酶切产物,测 *D* 值确定浓度,按照 lipofectmin 操作程序对 90%生长融合的低代 293A 细胞转染,按 lipofectmin

(μ L)/DNA(μ g)约 1:1 的比例以及每孔 1 ~ 5 μ L 的 lipofectmin 剃度进行转染,转染 8 h 后弃转染液,加入新鲜培养液 1 mL/孔,在观察出现 CPE 之前 3 日换液一次,出现 CPE 后停止换液。待 293A 细胞出现 100% CPE 时利用 -80 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C 各 15 min 反复冻融 3 次,吹打离心得到病毒上清。利用第一代病毒上清液 250 μ L 再次感染 75 cm² 培养瓶中的 293A 细胞以提高病毒滴度。同时提取病毒 DNA 进行 PCR 鉴定:用 TAKARA MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction kit 提取病毒 DNA,利用目的基因引物进行 PCR 鉴定,确认目的基因包含在病毒载体中。

TCID₅₀ 病毒滴度测定:在 96 孔板中分 8 个病毒稀释梯度,每个梯度 12 孔(一排),其中前 2 孔为阴性对照,实际每个梯度 10 孔,加入到 20 mL/L 胎牛血清培养液(DMEM)的 293A 细胞中,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 10 d。10 d 后倒置显微镜下观察,计算每一排中出现 CPE 的孔数,根据 $T = 10^{1+(S-0.5)}$,最后将 TCID₅₀/mL 转换为 PFU/mL。

1.5 大鼠 MSC 的分离,培养与鉴定

取 4 周龄 SD 雄性大鼠一只,断颈处死,750 mL/L 酒精浸泡 10 min,无菌下取双后肢股骨和胫骨,将其附着肌肉和结缔组织分离干净,PBS 冲洗,用无菌剪从中间剪短股骨及胫骨,用 5 mL 注射器注入 PBS 在断端冲洗骨髓直到骨质变白,冲洗液用 2 支 15 mL 离心管收集,250 \times g,离心 10 min,吸弃滤液,沉淀细胞中加入 100 g/L 高糖 DMEM 10 mL。用吸管吹打至单个悬细胞,接种于 2 个 25 cm² 培养瓶中,37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养;3 d 后半量换液,6 d 后全量换液,10 d 后细胞 80%汇合,用 2.5 mL/L 胰蛋白酶消化传代,继续培养。

第 3 代 MSC 利用流式细胞仪分别对 CD29、CD44、CD105 阳性,CD45 阴性进行检测鉴定;利用第 3 代 MSC 进行成脂诱导(含 1 μ mol/L 地塞米松, Insulin 10 mg/L, IBMX 0.5 mmol/L, Indomethacin 0.2 mmol/L 的 100 g/L 高糖 DMEM),成骨诱导(含 0.25 mmol/L 抗坏血酸、10 mmol/L β -磷酸甘油与 10 nmol/L 地塞米松的 100 g/L 高糖 DMEM),4 周后分别进行油红 O、茜素红染色进行鉴定。

1.6 试验分组

分别根据转染时不同的感染复数(multiplicity

of infection, MOI)将试验组分为 A、B、C、D 4 组(A 组 MOI = 0.1; B 组 MOI = 1; C 组 MOI = 10; D 组 MOI = 100); 对照组: 利用 Ad-LacZ 转染(MOI = 10)作为阳性对照 E 组, 未加病毒转染(MOI = 0)作为阴性对照 F 组; 每一个实验组用 12 孔(两个 6 孔板)进行试验观察。

1.7 转染过程

将第 3 代 MSC 传代与 12 个 6 孔板中 (5×10^4 cells/孔), 标记各板, 24 h 完全贴壁后各板各孔按原计划计算加入病毒液量, 轻轻平摇 1 min, 使病毒液与培养基均匀混合, 放回培养箱继续培养, 12 h 后弃培养基, 换新鲜培养基。3 d 后换液, 每孔加入新鲜培养基 1 mL, 7 d 后换液, 同时保留培养液用于检测。10 d 后再次换液, 14 d 后再次换液, 保留培养液用于检测。

1.8 培养液碱性磷酸酶活性、骨钙素含量的检测

操作方法按试剂盒说明书, 同时利用考马斯兰法测定培养液培养液中蛋白的含量, 将碱性磷酸酶活性换算成 u/mg。

1.9 免疫组化检测 I 型胶原蛋白, 骨钙素, 以及骨钙结节的检测

利用盖玻片置于六孔板中便于细胞爬片, 转染 2 周后取出玻片, 按免疫组化试剂盒说明书进行相关步骤操作。3 周后进行茜素红染色, 观察骨钙结节形成情况。

1.10 Western-blot 检测 LMP-1 基因在 MSC 中的表达情况

转染 48 h 后利用细胞裂解液冰上裂解细胞, 收集蛋白进行 SDS-PAGE 电泳; 经过转膜, 一抗二抗孵育以及显色反应, 摄片观察保存。

1.11 统计学处理

试验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SAS8.1 统计学软件进行统计处理, 组间差异利用方差分析, 组间两两比较采用 SNK 统计。

2 结 果

2.1 成骨细胞的分离、培养和初步鉴定

成骨细胞接种后 24 h 后即可见大量贴壁细胞, 细胞呈长梭型, 多角形或不规则型, 48 h 后可见细胞融合 70% ~ 80%。

2.2 成骨细胞的总 RNA 提取

总 RNA 后电泳结果显示: 可见 18S 和 28S 两

条条带, 亮度 28S:18S \approx 2:1, 初步表示所提 RNA 完整。分光光度测定结果: $D(260) = 0.473$, $D(280) = 0.233$, $D(260)/D(280) = 2.03$, 表示所提 RNA 纯度符合要求(图 1A)。

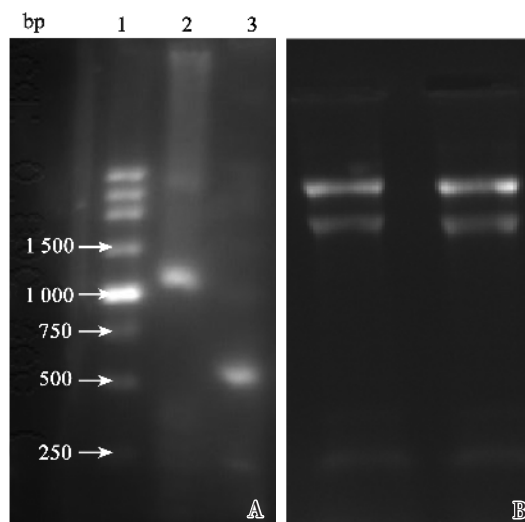


图 1 成骨细胞总 RNA 与 LMP-1 基因 RT-PCR 产物电泳图

Fig.1 Total RNA of the osteoblast and RT-PCR product of LMP-1

A: The total RNA was detected by 1% agarose gel electrophoresis, which showed the 28S:18S \approx 2:1, and the 5S was found ahead of them. B: The RT-PCR products showed that the LMP-1 target gene in the line 2 was approximately 1300 bp, which was consistent with expectation. The line 3 was an internal product.

2.3 RT-PCR 获取与扩增 LMP-1 基因

取目的与内参 PCR 产物各 5 μ L 进行电泳(图 1B)。

2.4 入门克隆的酶切鉴定

入门克隆的酶切鉴定结果见图 2。

2.5 病毒质粒载体与测序结果

病毒表达质粒送于上海英俊生物公司测序, 并与 Genbank 中 LMP-1 (基因号: AF095585) 做 BLAST 比较, 发现系列一致, 没有突变。

2.6 病毒载体在 293A 细胞中的包装

按照前述条件转染, 8 d 后 293A 细胞出现约 100% CPE (细胞病毒效应), 细胞感染病毒后, 用病毒上清提取病毒 DNA 为模板, 以前述目的基因引物为引物作 PCR 检测, 电泳可检测出目的条带, 说明病毒液中含有目的基因(图 3)。

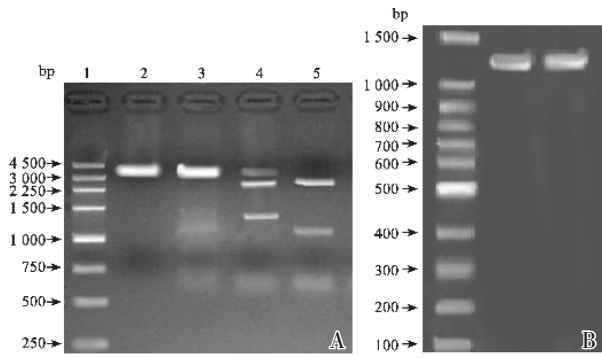


图 2 入门克隆的酶切产物以及转染质粒 DNA 为模板的 PCR 电泳图

Fig.2 The entry clone and the PCR product of the viral DNA templates

A: The entry clone was verified by digestion, line 4 was the entry clone, line 2 and 3 were the product digested by NotI, Asc I respectively, which were both approximate 3 900 bp, Line 5 was the digested product by both Not I and Asc I. The LMP-1 gene was located at about 1 300 bp as expected. B: The PCR product of the viral DNA templates extracted from viral supernatant, the target gene is about 1 300 bp.

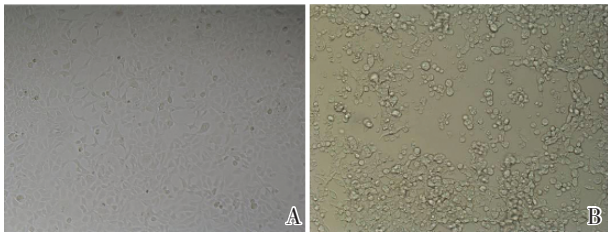


图 3 293A 细胞以及感染病毒后出现细胞病毒效应的 293A 细胞

Fig.3 The 293A Cells and the viral infected 293A cells

A: 80% confluence of 293A cells, irregular-shaped, grew adhered vigorously. ($\times 100$); B: The infected 293A cells appeared 100% CPE, cells necrosis, and became round, small, and Grape-like floating. ($\times 100$)

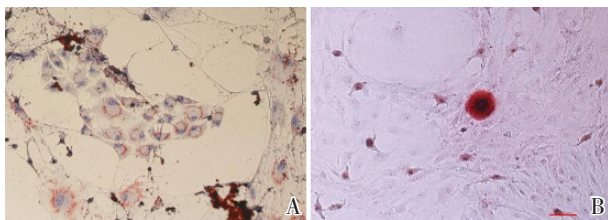


图 4 MSC 成骨细胞与成脂肪细胞定向诱导后鉴定

Fig.4 Adipocyte and osteoblast induction of MSC

A: The adipocyte was found after the MSC were adipoinduced, the lipid droplets was stained red by oil O. ($\times 200$); B: The bone nodule accumulated after MSC osteoinduced, which was stained red by alizarin red. ($\times 200$)

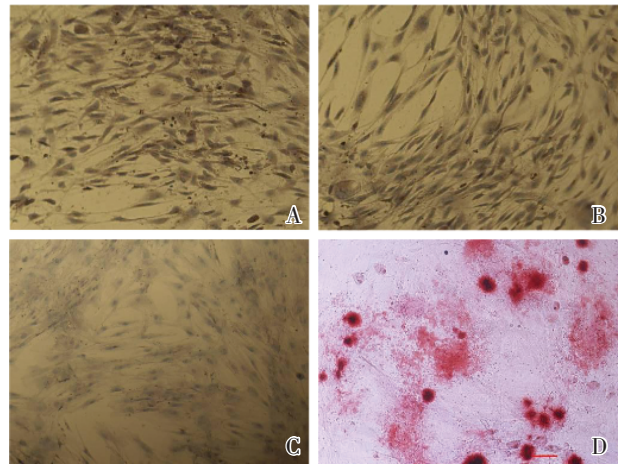


图 5 LMP-1 转染 MSC 后的成骨活性

Fig.5 Osteogenic activity of the LMP-1 transfected MSC

A: Immunohistochemical staining showed the expression of osteocalcin in MSC after infected, the positive cells was that the brown particle in its ($200 \times$) cytoplasm; B: Immunohistochemical staining showed the rich expression of collagen I in MSC after infected. ($200 \times$); C: Immunohistochemical staining showed the few expression of collagen I of MSC after the pAd/CMV/V5-LacZ infected. ($200 \times$); D: A number of bone nodules were found 3 weeks after infection, and the bone matrix secreted by MSC was also found, which were stained red. ($200 \times$)

2.7 全骨髓细胞培养

3 d 后可见少量长梭形贴壁细胞, 半量换液, 1 周后可见 MSC 贴壁集落形成, 细胞疏密不均, 9 d 后予以传代, 第 2 代 MSC 呈长梭形、纺锤形生长, 形态仍不均, 3 代 MSC 呈长梭形, 漩涡状生长, 形态较为均一。将第 3 代 MSC 进行成骨成脂诱导 4 周后进行茜素红以及油红 O 染色, 分别可见矿化结节以及脂滴阳性显色。将第 3 代 MSC 进行流式细胞仪检测, 可见 CD29⁺ 约 96.27%; CD44⁺ 约 99.51%; CD105⁺ 约 90.38%; CD45⁻ 约 96.08%。

2.8 转染后培养液中碱性磷酸酶测定

分别收集转染 1 周后, 2 周后各组各孔的培养液, 利用 ELISA 方法测定 ALP 含量, 发现个转染组在 1 周末, 2 周末的 ALP, 含量均高于对照组, 经过方差分析统计比较, F 值分别为: 106.19 和 9.92, 均 $P < 0.01$, 差异具有统计学意义; SNK 两两比较, 发现除 E 组, F 组差异比较没有统计学意义, 其余各组相互比较均具有统计学意义, 即表明当转染 MOI = 10 具有最强的诱导碱性磷酸酶活性作用。

2.9 转染后骨钙素的测定

收集各组各孔 1 周后, 2 周后的培养液, 利用

ELISA法测定骨钙素含量,发现各组比较情况与ALP类似,方差分析结果,F值分别为:114.88和193.15,均 $P < 0.001$,各组差异具有统计学意义;两两比较,E组,F组,以及两周的B组与D组差异比较没有统计学意义,其余各组相互比较均具有统计学意义,表明转染MOI = 10时具有最强的诱导骨钙素表达作用,与上述碱性磷酸酶一致(表1,2)。

表 1 培养基的 ALP 浓度

Table 1 The ALP concentration of the culture medium

Group	(U/mg)	
	1 W	2 W
A: MOI = 0.1	0.256 ± 0.036	0.286 ± 0.029
B: MOI = 1	0.350 ± 0.028	0.358 ± 0.022
C: MOI = 10	0.395 ± 0.042	0.405 ± 0.035
D: MOI = 100	0.302 ± 0.011	0.309 ± 0.008
E: Ad-LacZ control	0.138 ± 0.011	0.146 ± 0.018
F: MOI = 0	0.136 ± 0.006	0.143 ± 0.021

ANOVA showed the difference among the groups were significantly ($P < 0.05$), SNK test showed all the difference between each other were significantly except group E and F. The result indicated the group C (MOI = 10) had the highest ALP activity of all the groups)

表 2 培养基的骨钙素的浓度

Table 2 The Osteocalcin concentration of the culture medium

Group	(ng/mL)	
	1 W	2 W
A: MOI = 0.1	3.46 ± 0.20	3.46 ± 0.21
B: MOI = 1	5.09 ± 0.036	4.78 ± 0.50
C: MOI = 10	5.11 ± 0.22	5.02 ± 0.32
D: MOI = 100	4.80 ± 0.26	4.88 ± 0.14
E: Ad-LacZ control	3.00 ± 0.15	3.09 ± 0.15
F: MOI = 0	3.04 ± 0.12	3.00 ± 0.14

ANOVA showed the difference among groups were significantly ($P < 0.05$), SNK test showed all the difference between each other were significantly except group B, D. The result indicated the group C (MOI = 10) had the highest activity of osteocalcin of all groups)

2.10 免疫组化

显示转染 2 周后组骨钙素, I 型胶原的表达明显高于对照组, 3 周后茜素红染色显示矿化结节染色明显, 结果显示见图 5 A-D。

2.11 Western-blot 检测

LMP-1 基因在 MSC 中的表达, 可见转染组表

达的浓度显著高于对照组(图 6)。

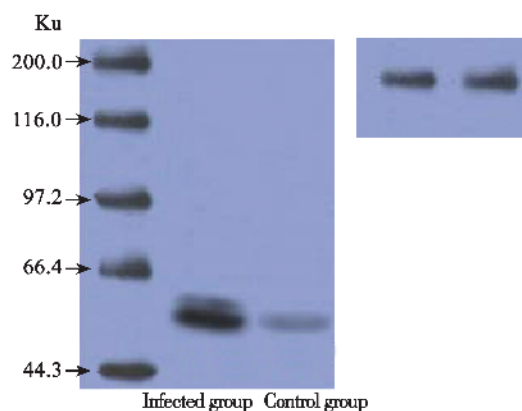


图 6 MSC 的 LMP-1 蛋白产物 Western-blot 电泳图

Fig.6 Western blot showed the expression of LMP-1 protein in MSC

Left picture showed the protein was about 52 ku as expected, and the obvious stronger expression in infected group compared to the control group. Right picture is the normalized GAPDH.

3 讨论

由于骨质疏松(osteoporosis, OP)患者成骨能力低下,骨折手术失败率高,愈合缓慢甚至不愈合^[2],OP骨折的治疗多年以来一直是困扰骨科临床医生的难题之一。基因治疗骨质疏松骨折目前仍是一个有待开垦的崭新领域。MSC的生物学特性表明它能作为基因治疗理想的靶细胞和载体,LMP-1作为细胞内的蛋白不仅能高效地诱导骨的形成,更能刺激多种骨诱导因子(包括BMPs、TGF- β_1 等)的分泌,为骨折的修复提供非常有利的环境。因此选择LMP-1作为载体,以MSC作为基因治疗的靶细胞,LMP-1 cDNA转染MSC,促进MSC增殖和成骨细胞分化,提高MSC的成骨活性,用含LMP-1cDNA的MSC治疗OP骨折。是对基因治疗OP骨折这种新方法和途径的探索。

骨诱导因子大多是细胞外分泌型因子,是由细胞外蛋白或是由传递细胞间信号的多肽构成,如BMP等。与BMP不同,LMP-1是细胞内因子,作为细胞内信号分子,它能于体内、体外启动骨的形成。LMP-1不是分泌型因子,它是能刺激其它骨诱导因子合成和分泌的细胞内蛋白。表达LMP-1的细胞能合成和分泌多种不同骨诱导因子(包括BMP、TGF- β_1 等),同时招募临近的细胞分化并直接参加骨膜或软骨内成骨^[1],这样也就为

成骨能力低下的疏松骨组织提供了非常有利于骨形成的环境。动物以及体外实验表明,使用非常小剂量的腺病毒或质粒载体转染 LMP-1 cDNA 的骨髓细胞,能持续高效地诱导骨形成,促进脊柱的融合。CT 扫描还显示表达 LMP-1 细胞的存在增加了融合块的密度并使载体边界有更多的骨形成^[3-5]。国内外关于骨诱导因子促进骨形成的大多数研究都集中在 BMP 上,关于 LMP-1 的研究相对较少^[6]。研究的对象主要为骨缺损的修复以及脊柱的后路融合,途径为转基因技术和重组蛋白应用。研究表明,两种方法均能促进骨的形成,但基因治疗较重组蛋白必要时能提供更持续的蛋白释放,而且能以更符合生理要求的方式提供蛋白^[7]。重组蛋白诱导的新骨不规则地填充于骨折端的边缘,骨小梁比较脆弱,象壳一样围绕骨缺损处;转基因诱导的新骨为坚实的三维骨小梁结构,并重建形成新的骨皮质^[8]。与 BMP 不同,LMP-1 为细胞内信号分子直接刺激成骨细胞的分化,并刺激其它骨诱导因子合成和分泌,因此治疗性应用 LMP-1,其基因 cDNA 的转染是必须的、也是最好的途径^[4]。LMP-1 在体内外高效的成骨作用是我们选择其作为治疗骨质疏松及其骨折候选基因的主要原因。

腺病毒是目前转基因实验研究中使用最多的病毒载体。目前大多采用 Adeasy 系统来构建和包装腺病毒载体。本试验采用了 Invitrogen 公司的 Gateway™ 技术进行病毒载体构建,首先将目的基因进行 TOPO 定向克隆至入门载体,然后利用入门载体克隆与病毒骨架在体外进行同源重组,将目的基因转入病毒骨架,转化筛选,整个过程只需两步。这项技术的特点是只需设计引物时在目的基因前加上 CACC 接头,PCR 产物即可利用接头与入门载体 pENTR/D-TOPO 进行 TOPO 定向克隆,5 min 即形成入门克隆,再转化细菌筛选阳性克隆,由于入门载体自身是线性,只有在 TOPO 克隆成功才能与目的基因连接成环状,完成滚环复制,因此所得阳性克隆特异性高。入门克隆获取后可利用同源位点和表达载体 pAD/CMV/V5-DEST™ 在体外进行同源重组反应,只需 6 ~ 8 h 并可转化细菌筛选重组子,同时由于表达载体含有自我死亡基因 ccdB,重组后被目的基因替代,没有重组成功的表达载体自然死亡,重组子的特异性也相对特异较高。除了用来鉴定外,构建过程中不需要酶切反应,不需要蓝白菌落筛选,整个构建

过程操作相对简单、快捷。本实验结果表明,利用 Gateway™ 技术构建 LMP-1 重组腺病毒载体不仅大大简化了基因克隆的步骤,而且显著提高了克隆效率。获得的 pAd-LMP-1 可进一步用于基因治疗理想的靶细胞的转染,构建骨质疏松症及其骨折的基因治疗的细胞载体。

将 pAd-LMP-1 转染 MSC 后,LMP-1 基因能促进 MSC 向成骨方向分化,加强其成骨作用。但目前对 LMP-1 的研究主要是利用重组蛋白或是基因转导的方式来观察其在脊柱融合及骨质缺损中的作用^[4-5]。而未使用表达 LMP-1 细胞的治疗组却未获得融合^[5]。但是,如何将转染 pAd-LMP-1 的 MSC 运用于骨质疏松及其骨折的治疗仍有待于进一步研究,这也是研究进一步工作的目的。

值得注意的是,由于 LMP-1 的强效骨诱导作用,治疗浓度所需的含 LMP-1 重组病毒远远低于其他基因的重组病毒,Viggeswarapu 在利用腺病毒载体将 LMP-1 基因转导至成骨细胞的实验中,发现 MOI = 0.25 时成骨作用最为明显,远远低于 BMP 基因转导所需的高滴度病毒 (MOI = 40 ~ 500)^[5],表明了 LMP-1 基因强效的成骨作用,同时由于所需的病毒滴度降低,引起机体的免疫反应少,更适合临床前景应用。本试验发现 LMP-1 在转导 MSC 时,所用的 MOI = 10 既表现出明显的成骨作用,MOI 低于文献中一般基因病毒转导 MSC 所需要的 MOI^[5],但高于 Viggeswarapu 试验中转导成骨细胞。这一情况可能是由于病毒滴度计算存在有主观差异,也有可能成骨细胞和骨髓间充质干细胞两种宿主细胞的特性有关。

目前国内外在研究骨科疾病基因治疗时多选用 MSC 作为体外基因转导的靶细胞^[9]。MSC 是成体干细胞之一,具有多向分化潜能,可分化为成骨细胞、软骨细胞和神经细胞等多种细胞。骨质疏松个体的 MSC 数量减少,质量也下降,增殖和成骨细胞分化能力减弱,成骨能力也显著降低。MSC 主要存在于骨髓基质中,取材相对较容易,分离培养简单。含治疗基因的 MSC 不仅可以表达有用的骨诱导蛋白,而且自身可以分化成成骨细胞等参与骨重建,它可以通过自分泌机制诱导自身成骨分化,通过旁分泌机制诱导附近的干细胞向成骨分化^[10]。本研究的结果表明,MSC 转染 LMP-1 后,不仅增殖、分化能力显著提高,而且成骨活性显著增强。这一结果与文献报道基本相符,因此 MSC 转

染骨诱导因子后不仅可修复骨缺损,也为骨质疏松及其骨折的基因治疗提供了一个新的平台^[11]。MSC 的这些特性,使其成为骨科基因治疗研究的理想靶细胞,但是近年对 MSC 在体内恶性转化问题越来越被关注,有实验报道 MSC 移植导致癌基因突变从而出现纤维肉瘤恶变^[12],这一试验结果向包括基因治疗在内的干细胞移植提出挑战,因此干细胞移植在体内的转归以及相关安全性仍需更进一步的研究。

参考文献:

- [1] Boden SD, Liu Y, Hair GA, et al. LMP-1, a LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation [J]. *Endocrinology*, 1998, 139(12): 5125–5134.
- [2] Stromsoe K. Fracture fixation problems in osteoporosis [J]. *Injury*, 2004, 35(2): 107–113.
- [3] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(20): 8125–8148.
- [4] Minamide A, Boden SD, Viggswarapu M, et al. Mechanism of bone formation with gene transfer of the cDNA encoding for the intracellular protein LMP-1 [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85-A(6): 1030–1039.
- [5] Viggswarapu M, Boden SD, Uu Y, et al. Adenoviral delivery of LIM mineralization protein-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83A(3): 364–376.
- [6] Egermann M, Schneider E, Evans CH, et al. The potential of gene therapy for fracture healing in osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 2005, 16 (Suppl 2): S120–128.
- [7] Kumar S, Ponnazhagan S. Gene therapy for osteoinduction [J]. *Curr Gene Ther*, 2004, 4(3): 287–296.
- [8] Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1999, 81(7): 905–917.
- [9] Bosch P, Fouletier-Dilling C, Olmsted-Davis EA, et al. Efficient adenoviral-mediated gene delivery into porcine mesenchymal stem cells [J]. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(11): 1393–1340.
- [10] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(4): 568–584.
- [11] Pelled G, G T, Aslan H, et al. Mesenchymal stem for bone gene therapy and tissue engineering [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8(21): 1917–1928.
- [12] Li H, Fan X, Kovi RC, et al. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10889–10898.

(编辑 徐杰)

(上接第 198 页 from page 198)

- GA(2)LEN and AllerGen) [J]. *Allergy*, 2008, 63 (Suppl 86): 8–160.
- [4] Huang JF, Thurmond RL. The new biology of histamine receptors [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2008, 8(1): 21–27.
- [5] Ling P, Ngo K, Nguyen S, et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation [J]. *Br J Pharmacol*, 2004, 142(1): 161–171.
- [6] Godot V, Arock M, Garcia G, et al. H4 Histamine receptor mediates optimal migration of mast cell precursors to CXCL12 [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120(4): 827–843.
- [7] Gutzmer R, Diestel C, Mommert S, et al. Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2005, 174(9): 5224–5232.
- [8] 彭华, 李添应. 组胺 H4 受体在变态反应性炎症中的作用 [J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2009, 2 (3): 208–213.
- [9] Marshall JD, Secrist H, DeKruyff RH, et al. IL-12 inhibits the production of IL-4 and IL-10 in allergen-specific human CD4+ T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 1995, 155(1): 111–117.

(编辑 刘清海)